

Направленный рост и миграция стромальных клеток костного мозга в культуре *in vitro*

Р.В. Деев¹, Н.В. Цупкина², Г.П. Пинаев²

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова

² Институт цитологии РАН

R.V. Deev¹, N.V. Tsupkina², G.P. Pinaev²

¹ Kirov Military Medical Academy; ² Institute of Cytology RAS

Guided growth and migration of bone marrow stromal cells in culture *in vitro*

На модели *in vitro* подтверждена способность культуры стромальных клеток костного мозга кролика реагировать направлением миграции и роста колонии в ответ на хемотаксический стимул. В качестве источника хемотаксического стимула использованы аутогенные по отношению к культуре клетки фрагменты жизнеспособной и девитализированной пластинчатой костной ткани. Установлено, что в условиях клеточной культуры стромальные клетки в большей степени отвечают на сигналы жизнеспособной кости, что, вероятно, обусловлено продукцией биологически активных веществ клетками костного фрагмента. Невыраженная реакция культуры на присутствие девитализированной костной ткани, вероятно, обусловлена изменением свойств костной ткани после потери жизнеспособности, в частности, изменениями белков внеклеточного матрикса.

Обсуждено возможное воздействие на миграцию клеток культуры клеток различных факторов.

Ключевые слова: стромальные клетки, хемотаксис, миграция клеток, костная ткань.

Введение

В последнее время все большее внимание исследователей привлекают возможности клеточной трансплантации для коррекции патологии скелетных тканей. Показано, что клетки с облигатной или факультативной остеогенной детерминацией (мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), стромальные клетки костного мозга, остеогенные клетки, остеобласты) при их трансплантации в организм реципиента участвуют в процессах остеогенеза. Такие сведения получены при свободных пересадках указанных клеток в область переломов и дефектов костей [1, 2]. При системном введении ядродержащих клеток костного мозга, включающих фракцию стромальных клеток, они также демонстрируют тропность к костной ткани реципиента и продуктивно участвуют как в репаративном (восстановительном) [3], так и в физиологическом [4, 5] костеобразовании. На использовании данного феномена основаны клинически приемлемые способы коррекции системных заболеваний костной ткани [6, 7].

Несмотря на большое количество полученных экспериментальных и клинических данных, механизмы данного явления остаются недостаточно изученными.

Цель работы: в модельной системе *in vitro* зарегистрировать признаки миграции или направленного роста стромальных клеток костного мозга в ответ на остеогенный стимул.

Материал и методы

Культуру стромальных клеток кролика получали из костного мозга, заключенного в гребнях подвздошных костей. Клетки высевали в одноразовую пластиковую посуду (чашки Петри) из расчета 5–7×10⁵ клеток на 1 см² площади дна. Среда имела следующий состав: DMEM (ISN, США) и F12

Using a simple model *in vitro* the capability of rabbit bone marrow stromal cells to respond to chemotactic stimulus by guiding migration and growth of the colony was substantiated. As a source of chemotactic stimulus vital and devitalized laminar bone tissue fragments autogenic to cells culture were used. It has been stated that under cellular culture conditions stromal cells respond largely to vital tissue signals which might have been due to biological active substances produced by cells of a bone fragment. Obscure-response of culture to devitalized bone tissue presence may have been due to bone tissue properties alteration after devitalization, in particular, alterations of intracellular matrix proteins.

Possible influence of different factors to cells culture migration has been discussed.

Key words: stromal cells, chemotaxis, cells migration, bone tissue.

(ISN, США) в соотношении по объему 3:1 с добавлением 20% эмбриональной коровьей сыворотки (Биолот, РФ; ISN, США), гентамицина сульфата (50 мкг/мл). Смену среды производили каждые 3 суток. По достижении монослоя, культуру пассировали в одноразовой посуде, на дне которой были уложены круглые покровные стекла диаметром 1,0 см. После того, как поверхность стекол полностью покрывалась клетками, их извлекали и монтировали в новых чашках Петри точно в центре. Культуральная среда имела прежний состав. В зависимости от опыта культивирование проводили в присутствии аутогенных по отношению к клеткам жизнеспособных и девитализированных костных фрагментов. Девитализацию проводили путем трехкратного быстрого замораживания–оттаивания. Контроль девитализации осуществляли при помощи помещения кусочков в питательную среду и с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Ни в одном случае не было обнаружено роста *in vitro* и целых жизнеспособных клеток. Также СЭМ подвергали жизнеспособные кусочки костей после культивирования.

В дальнейшем опыты повторили после нанесения на дно чашек коллагенового геля, получаемого из соединительной ткани сухожилий лабораторных животных. В качестве контроля использовали изолированную культуру стромальных клеток на покровных стеклах.

Через 1 неделю культивирования культуру фиксировали 4% раствором параформальдегида, окрашивали по Романовскому–Гимза (азур II–эозин). Состояние культуры оценивали визуально.

Подготовку препаратов костных фрагментов для сканирующей электронной микроскопии выполняли по традиционной методике [8]. Фиксировали 2% глутаровым альдегидом. После обезвоживания образцы покрывали

медью в аппарате низкотемпературного напыления JFC-1100. Изучение проводили в сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM – 35С при ускоряющем напряжении 15 kV.

Результаты

В контроле клетки, находившиеся на покровных стеклах в центре чашек Петри, за срок наблюдения равномерно пролиферировали и мигрировали на дно чашки по всему периметру (рис. 1). Причем, на чашках, у которых дно было обработано раствором коллагена, этот процесс был более выражен. Иногда наблюдались свободные отсевы в виде дискретных единичных колоний.

При культивировании стромальных клеток с фрагментами девитализированной кости достоверных данных в пользу влияния на рост колонии клеток не получено. Характер роста культуры был аналогичен контролю. Культура росла центробежно от покровного стекла, лишь незначительно распространяясь

по дну культурального сосуда (см. рис. 1А). Этот процесс был несколько более выражен в чашках, покрытых коллагеновым гелем.

При кокультивировании с фрагментами аутогенных жизнеспособных кусочков костной ткани получены иные данные. На чашках, не обработанных коллагеном, наблюдали миграцию клеток с покровных стекол на дно, преимущественно в сторону локализации кусочка кости (см. рис. 1В). Причем, в ряде случаев клетки формировали колонии, вытянутые в сторону живой кости. В чашках, покрытых коллагеном, культура характеризовалась более выраженным ростом, большей площадью экспансии дна, причем, несмотря на то, что из-за многочисленных дискретных колоний, являющихся отсевами основной колонии и отсевами от сохранивших жизнеспособность клеток эксплантированного кусочка кости, преимущественное направление роста было сохранено – в сторону живой кости.

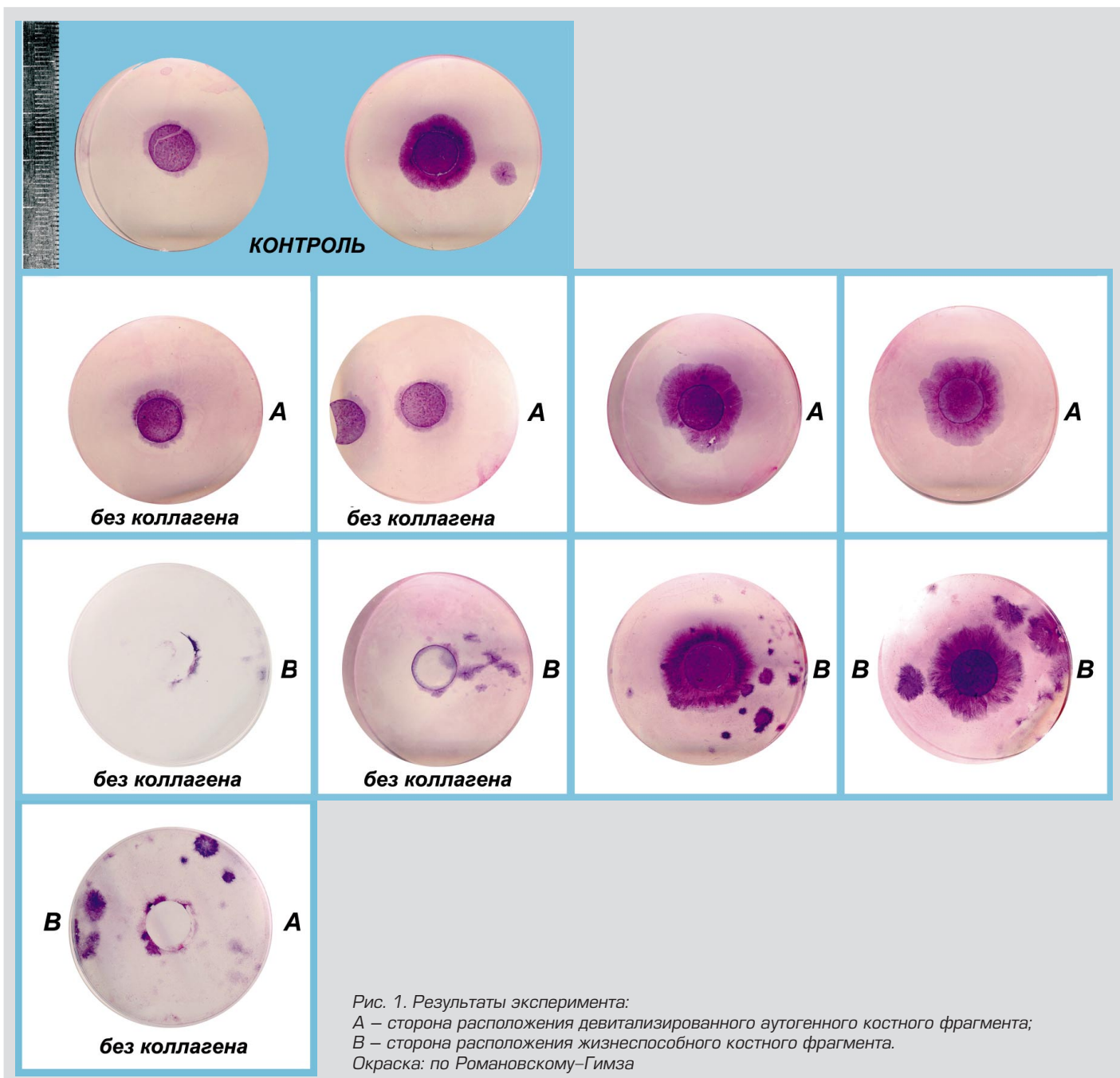


Рис. 1. Результаты эксперимента:
 А – сторона расположения девитализированного аутогенного костного фрагмента;
 В – сторона расположения жизнеспособного костного фрагмента.
 Окраска: по Романовскому-Гимза

При культивировании в одной чашке и девитализированного, и живого фрагмента кости клетки мигрировали преимущественно в сторону жизнеспособного кусочка (см. рис. 1В, А).

Обсуждение

Полученные в простом модельном эксперименте данные дают наглядное представление о том, каким образом процессы миграции могут осуществляться *in vivo*. В организме подобные ситуации могут возникать в случаях физиологической регенерации костной ткани, когда клетки камбиального резерва естественным образом расходуются на ремоделирование кости и поддержание ее морфофункционального гомеостаза. При репаративной регенерации для процессов остеогенеза рекрутируются костномозговые остеогенные клетки-предшественники, входящие составной частью в строму костного мозга. Показано, что помимо местной миграции под воздействием паракринных факторов хемоаттракции, указанные клетки способны мигрировать посредством системного кровотока [9]. Искусственно такая ситуация воспроизводится при трансфузиях. Молекулярные механизмы хоуминга данных клеток требуют особого обсуждения.

В сохранивших свою жизнеспособность клетках фрагментов костной ткани – остеобластах, клетках периваскулярного микроокружения, заключенных в гаверсовых каналах – идут активные цитофизиологические процессы. Ранее нами было показано, что эти клетки способны пролиферировать на поверхности эксплантированного костного фрагмента, мигрировать на подложку (рис. 2); синтезировать щелочную фосфатазу, свидетельствующую в данном случае об остеогенной дифференцировке клеток [10]. Следует предположить, что помимо синтеза щелочной фосфатазы, клетки в данных условиях вырабатывают и ряд других биологически активных молекул.

Большое внимание исследователей в последнее время приковано к Stromal-derived factor-1 (SDF-1). Оказалось, служащий аттрактантом для клеток различных типов, он способен воздействовать и на стромальные клетки в качестве ауто- или паракринного регулятора. Возможно данный

фактор является стадиейспецифичным, при нарастании остеогенной дифференцировки клеток их способность продуцировать SDF-1 снижается [11], вместе с тем показано, что дифференцированные остеобласты также продуцируют SDF-1 [12]. В экспериментах *in vitro* с остеобластами человека, стромальными клетками костного мозга человека, мыши и крысы установлено, что ряд цитокинов индуцируют выработку SDF-1, к ним относятся IL-1 β , PDGF-BB, VEGF, TNF- α и паратиреоидный гормон; TGF- β 1 – уменьшает его выработку [13], что подтверждено идентификацией растворенного SDF-1 в культуральной среде.

Взаимодействие SDF-1 с его рецептором – CXCR4 приводит к перестройкам цитоскелета клеток, благодаря которым становится возможной их миграция под действием хемотаксиса в локусы ремоделирования кости [13, 14]. Именно этому взаимодействию сегодня придают ведущее значение в хемоаттракции стромальных клеток.

Одним из ключевых факторов регуляции механоцитов являются костные морфогенетические белки (bone morphogenetic protein, BMP). Они вызывают дифференцировку ММСК в клетки остеогенной линии. Сохраненный при особых условиях костный матрикс содержит факторы роста, в частности, BMP, который является хемоаттрактантом для остеогенных клеток-предшественников, что показано в условиях *in vitro* путем микрокинотомии в ответ на внесение в культуральную систему рекомбинантного BMP-7 [15]. Аналогичный эффект вызывают BMP-2, BMP-4 в концентрации 10 нг/мл [16, 17], при этом отмечено, что rhTGF- β 1 и rhbFGF не обладают таким свойством. Эти данные остаются весьма противоречивыми, так, Makhijani N.S. с соавт. (2005) показали дозозависимый положительный хемотаксис остеогенных клеток в ответ на внесение в культуральную среду трех изоформ трансформирующего фактора роста: на TGF- β 1 или - β 3 – в чистом виде, а в ответ на TGF- β 2 – только в присутствии ретиноевой кислоты [18].

Фактор роста фибробластов был использован для биологически активной модификации скаффолда, позволяющей привлекать ММСК и оптимизировать их адгезию [19]; аналогичное применение находит и костный сиалопротеин [20].

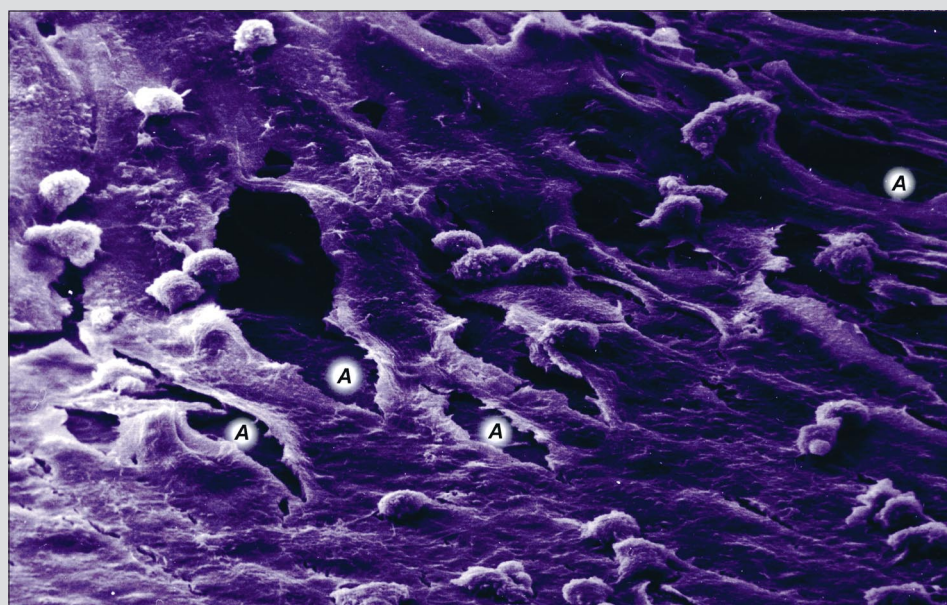


Рис. 2. Миграция стромальных клеток с фрагмента кости на дно культурального сосуда (А). Сканирующая электронная микроскопия. Ув.: $\times 600$

Еще одним фактором, стимулирующим миграцию стромальных клеток является тромбоцитарный фактор роста (platelet derived growth factor, PDGF) [21–23]. Данный механизм, по мнению исследователей, может быть реализован при рекрутировании костномозговых предшественников остеобластов для ремоделирования костной ткани. Аналогичный эффект показан для сосудистого эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor, VEGF), чья экспрессия весьма выражена при протекании энхондрального остеогистогенеза. С наличием этого фактора связывают привлечение и дифференцировку предшественников остеобластов из стромы костного мозга [24].

В ходе наших экспериментов установлено, что культура стромальных клеток костного мозга кролика обладает свойством реагировать особенностями роста и миграции на присутствие в культуральной системе жизнеспособной, но поврежденной костной ткани. В случае кокультивирования с девитализированной костной тканью, в которой помимо

устранения жизнеспособных клеток–продуцентов биологически активных веществ, низкотемпературная обработка могла повлиять и на функциональную активность белков внеклеточного матрикса, культура стромальных клеток не демонстрировала изменение характера своего роста.

В присутствии жизнеспособной костной ткани клетки культуры активно мигрировали в сторону ее расположения. В случае, если дно чашки было покрыто коллагеном, клетки преимущественно не мигрировали на его поверхность, а активно пролиферировали, и колония, распространяясь центростремительно, занимала все большую площадь дна культурального сосуда. Коллаген, являясь основным белком внеклеточного матрикса соединительных тканей, представляет собой естественный субстрат для адгезии и пролиферации стромальных клеток, что используется для обработки поверхностей гидрофобных носителей для клеток (скаффолдов) [25, 26].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Денисов–Никольский Ю.И., Миронов С.П., Омеляненко Н.П., Матвейчук И.В. Актуальные проблемы теоретической и клинической остеартрологии. М.: ОАО Типография «Новости» 2005: 336.
2. Деев Р.В. Посттравматическая регенерация костной ткани при трансплантации культуры костномозговых стромальных клеток (экспериментальное исследование). Дис. ...канд. мед. наук., СПб.; 2006: 175.
3. Деев Р.В., Цупкина Н.В., Сериков В.Б. и др. Участие трансфузированных клеток костного мозга в репаративном остеогистогенезе. Цитология 2005; 46(9): 755–9.
4. Dominici M., Pritchard C., Garlits J.E. et al. Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004; 101(32): 11761–6.
5. Деев Р.В., Цупкина Н.В., Сергеев В.С. и др. Особенности физиологического и репаративного остеогенеза после трансфузии ядродержащих клеток костного мозга. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2006; 3(5): 54–8.
6. Horwitz E.M., Prockop D.J., Gordon P.L. et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. Blood 2001; 97(5): 1227–31.
7. Horwitz E.M., Gordon P.L., Koo W.K. et al. Isolated allogeneic bone marrow–derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002; 99(13): 8932–7.
8. Миронов А.А., Комиссарчик Я.В., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине: метод. руководство. СПб.: Наука 1994: 400.
9. Илизаров Г.А., Палиенко Л.А., Шрейнер А.А., Богомяков В.С. Динамика численности костномозговых клеток, образующих колонии фибробластов в культуре, и её связь с активностью остеогенеза при репаративной регенерации в условиях удлинения конечности. Онтогенез 1983; 14(6): 617–23.
10. Гололобов В.Г., Деев Р.В., Николаенко Н.С. и др. Характеристика культуры пластинчатой костной ткани in vitro. Морфология 2004; 125: 64–8.
11. Kortessidis A., Zannettino A., Isenmann S. et al. Stromal–derived factor–1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. Blood 2005; 105(10): 3793–801.
12. Neiva K., Sun Y.X., Taichman R.S. The role of osteoblasts in regulating hematopoietic stem cell activity and tumor metastasis. Braz. J. Med. Biol. Res. 2005; 38(10): 1449–54.
13. Jung Y., Wang J., Schneider A. et al. Regulation of SDF–1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. Bone 2006; 38(4): 497–508.
14. Lisignoli G., Tneguzzi S., Piacentini A. CXCL12 (SDF–1) and CXCL13 (BCA–1) chemokines significantly induce proliferation and collagen type I expression in osteoblasts from osteoarthritis patients. J. Cell Physiol. 2006; 206(1): 78–85.
15. Lee D.H., Park B.J., Lee M.S. et al. Chemotactic Migration of Human Mesenchymal Stem Cells and MC3T3–E1 Osteoblast–Like Cells Induced by COS–7 Cell Line Expressing rhBMP–7. Tissue Eng. 2006; Epub. ahead of print.
16. Fiedler J., Roderer G., Gunther K.P., Brenner R.E. BMP–2, BMP–4, and PDGF–bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. J. Cell Biochem. 2002; 87(3): 305–12.
17. Gonnerman K.N., Brown L.S., Chu T.M. Effects of growth factors on cell migration and alkaline phosphatase release. Biomed. Sci. Instrum. 2006; 42: 60–5.
18. Makhijani N.S., Bischoff D.S., Yamaguchi D.T. Regulation of proliferation and migration in retinoic acid treated C3H10T1/2 cells by TGF–beta isoforms. J. Cell Physiol. 2005; 202(1): 304–13.
19. Ma Z., Gao C., Gong Y., Shen J. Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor. Biomaterials 2005; 26(11): 1253–9.
20. Karadag A., Fisher L.W. Bone sialoprotein enhances migration of bone marrow stromal cells through matrices by bridging MMP–2 to alpha(v)beta3–integrin. J. Bone Miner. Res. 2006; 21(10): 1627–36.
21. Fiedler J., Roderer G., Gunther K.P., Brenner R.E. BMP–2, BMP–4, and PDGF–bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. J. Cell Biochem. 2002; 87(3): 305–12.
22. Fiedler J., Etzel N., Brenner R.E. To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF. J. Cell Biochem. 2004; 93(5): 990–8.
23. Celotti F., Colciago A., Negri–Cesi P. et al. Effect of platelet–rich plasma on migration and proliferation of SaOS–2 osteoblasts: role of platelet–derived growth factor and transforming growth factor–beta. Wound Repair Regen. 2006; 14(2): 195–202.
24. Fiedler J., Leucht F., Waltzenberger J. VEGF–A and PlGF–1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005; 334(2): 561–8.
25. Швед Ю.А., Кухарева Л.В., Блинова М.И. и др. Влияние различных форм коллагеновых субстратов, прикрепленных к полимерной подложке, на рост и пролиферацию клеток кожи в культуре. Цитология 2006; 48(9): 810–1.
26. Suh H., Hwang Y.S., Lee J.E. et al. Behavior of osteoblasts on a type I atelocollagen grafted ozone oxidized poly L–lactic acid membrane. Biomaterials 2001; 22(3): 219–30.